

**Frozen food product****Patent number:** JP2000515751T**Publication date:** 2000-11-28**Inventor:****Applicant:****Classification:****- international:** C12N15/09; A23G9/02; A23L3/37; C07K14/415;  
C12P21/02**- european:** A23G9/02; A23G9/02K; A23J1/00F2; C07K14/415;  
C12N15/82C8B2**Application number:** JP19980508417T 19970704**Priority number(s):** WO1997EP03634 19970704; EP19960305497  
19960726**Also published as:**

WO9804699 (A1)

US6090917 (A1)

GB2315752 (A)

FR2751657 (A1)

DE19732135 (A1)

more &gt;&gt;

**Report a data error here**

Abstract not available for JP2000515751T

Abstract of corresponding document: **US6090917**

A process for the recovery of AFPs from natural sources, said process involving the steps of a) isolating an AFP containing juice from the natural source; b) heat treating the natural source or the AFP containing juice to a temperature of at least 60 DEG C.; c) removing the insoluble fraction.

---

Data supplied from the **esp@cenet** database - Worldwide

(19)日本国特許庁 (J P)

(12) 公表特許公報 (A)

(11)特許出願公表番号  
特表2000-515751  
(P2000-515751A)

(43)公表日 平成12年11月28日(2000.11.28)

(51)Int.Cl. <sup>7</sup>	識別記号	F I	テグメント* (参考)
C 1 2 N 15/09	Z N A	C 1 2 N 15/00	Z N A A
A 2 3 G 9/02		A 2 3 G 9/02	
A 2 3 L 3/37		A 2 3 L 3/37	A
C 0 7 K 14/415		C 0 7 K 14/415	
C 1 2 P 21/02		C 1 2 P 21/02	C
審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 29 頁)			

(21)出願番号 特願平10-508417  
(86) (22)出願日 平成9年7月4日(1997.7.4)  
(85)翻訳文提出日 平成11年1月13日(1999.1.13)  
(86)国際出願番号 P C T / E P 9 7 / 0 3 6 3 4  
(87)国際公開番号 W O 9 8 / 0 4 6 9 9  
(87)国際公開日 平成10年2月5日(1998.2.5)  
(31)優先権主張番号 9 6 3 0 5 4 9 7 . 8  
(32)優先日 平成8年7月26日(1996.7.26)  
(33)優先権主張国 ヨーロッパ特許庁 (E P)

(71)出願人 ユニリーパー・ナームローゼ・ベンノー  
ト・シャープ  
オランダ国、3013・エイエル・ロッテルダ  
ム、ヴェーナ 455  
(72)発明者 リルフォード、ピーター・ジョン  
英国、シャーンブロック・エムケイ44・1  
エルキュー、ユニリーパー・ハウス、ユニ  
リーパー・リサーチ・コロワース・ラボラ  
トリー (番地なし)  
(74)代理人 弁理士 山崎 行造 (外2名)

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 熱安定不凍タンパク質を含む冷凍食品

(57)【要約】

天然資源からA F P類を回収する方法であって、前記方  
法は、a)天然資源からA F Pを含む汁を分離し、b)  
天然資源又はA F Pを含む汁を少なくとも60℃へ加熱処  
理し、c)不溶性固分を除去する工程を含む。

## 【特許請求の範囲】

1. 天然資源からのAFP類の回収方法であって、前記方法は、
  - a) AFPを含む汁を天然資源から分離し、
  - b) 天然資源又はAFPを含む汁を少なくとも60℃の温度へ加熱処理し、
  - c) 不溶性画分を除去する、
 工程を含む、方法。
2. 工程a及びbが（いずれかの順序で）、工程cの前に行われる、請求項1記載の方法。
3. 60℃で1時間、80℃で1時間、又は100℃で10分間熱処理した後、氷の再結晶阻害特性において著しい減少を示さないことによって確認される熱安定性を有するAFP類。
4. -40℃へ急速冷凍し、続いて-6℃で1時間貯蔵した後、熱処理された水中のAFPの組成物の氷結晶の大きさが、熱処理されない同一のAFPの氷結晶の大きさよりも5μm未満しか大きくない、請求項3記載のAFP類。
5. -40℃への迅速な冷凍の後-6℃で1時間貯蔵した水中のAFPの組成物の氷結晶の大きさが、15μm以下である、請求項3乃至4記載のAFP類。
6. 25kDa、35kDa、及び65乃至75kDaの分子量を有するタンパク質を一つ以上含む、請求項3又は4記載のAFP類。
7. 25kDaのAFPが、
 

ALA-THR-ILE-THR-ALA-VAL-ALA-VAL-LE  
U-LYS-X-THR-VAL-GLU-VAL-X-ILE-VAL-  
PRO-THR、

35kDaのAFPが、

ALA-GLN-PHE-THR-ILE-THR-ASN-LYS-CY  
S-GLN-PHE-THR-VAL-TRP-ALA-ALA-X-VA  
L-PRO、

65乃至70kDaのAFPが、

X-GLU-GLN-PRO-ASN-THR-ILE-X-GYL-TH  
Hと実質的に相同であるN末端配列を含む、請求項6記載のAFP類。

8. 少なくとも一つの請求項7記載のAFP類をコードすることのできる核酸配列を含むベクター。
9. 少なくとも一つの請求項7記載のAFP類を発現することのできる形質転換された有機体。
10. 0.0001乃至0.5重量%の、請求項3記載のAFPを含む、冷凍菓子製品。
11. 請求項3記載のAFPを含む、請求項10記載の冷凍菓子製品の製造に使用するのに適するプレミックス。
12. 0.0001乃至0.5重量%のAFPを含む配合されたミックスの調製を含む冷凍菓子製品の製造法であって、前記AFPは、60℃で1時間、80℃で1時間、又は100℃で10分間熱処理し、静置条件下でミックスを冷凍した後、氷の再結晶阻害特性において著しい減少を示さないことによって確認される、熱安定性を有する、方法。

## 【発明の詳細な説明】

## 熱安定不凍タンパク質を含む冷凍食品

## 発明の技術分野

本発明は不凍タンパク質(AFP類)の分離方法、及びAFP類を含む冷凍食品に関する。

## 発明の背景

不凍タンパク質(AFP類)は、食品の冷凍耐性を改良することが示唆されている。

本発明の目的にかんがみ、AFPという語は、当業者に周知の意味を有し、すなわち、氷の結晶の成長を阻害する活性を示すタンパク質を意味する。例えば、米国特許第5,118,792号を参照のこと。

国際公開第90/13571号は、化学的又は組換えDNA技術によって製造された不凍ペプチドを開示している。AFP類は、食品中に適切に使用することができる。実施例3Bは、ウォーターアイス混合物が0.01重量%のAFPと組み合わせてフィルム状に冷凍される場合、改良された氷の結晶形を示す。

国際公開第92/22581号は、アイスクリーム中の氷結晶の形を制御するために使用することのできる植物由来のAFP類を開示している。この刊行物は、植物を破損することなく、抽出溶媒を葉に浸透させることにより、植物の細胞外空間からポリペプチド組成物を抽出する方法をも開示している。

国際公開第94/03617号は、酵母由来のAFP類の製造方法、及びアイスクリームへの使用可能性を開示している。国際公開第96/11586号は、微生物により製造された魚のAFP類を開示している。

文献の中には、凍害防止のための植物タンパク質の分離及び／又は使用を意図するものもある。凍害防止のタンパク質は、霜による損傷から植物膜を保護する機能を有する。しかし、これらのタンパク質は、再結晶阻害特性を有さず、したがって、AFP類という語の範囲内ではない。

Hinchaiは、Journal of Plant Physiology, 1992, 140, 236頁乃至240頁において、キャベツからの凍害防止タンパク質の分離を記載している。

Volgerは、*Biochimica et Biophysica Acta*, 412(1975), 335頁乃至349頁において、ホウレンソウからの凍害防止タンパク質の分離を記載している。

Bootheは、*Plant Physiol*(1995)、108:759頁乃至803頁において、ブラシカ・ナパス (*Brassica napus*) からのタンパク質の分離を記載している。再度、これらのタンパク質は、AFP類よりもむしろ凍害防止タンパク質と考えられている。

Nevenは、*Plant Molecular Biology* 21:291頁乃至305頁, 1993において、ホウレンソウの凍害防止タンパク質のDNA特性を記載している。

Salzmanは、*Abstracts and Reviews of the 18th Annual Meeting of the ASE V/Eastern Section in Am. J. Enol.Vitic.*, Vol.44, No.4, 1993において、ブドウ (*Vitis*) のつぼみの沸騰安定なポリペプチドの存在を記載している。タンパク質は魚の不凍ペプチドと同等であったが、それらは凍害防止タンパク質であってAFP類ではない。

Linは、*Biochemical and Biophysical Research Communication*, Vol.183, No.3, 1992, 1103頁乃至1108頁、及び、Lin、*Plant Physiology*(1992)99, 519頁乃至525頁において、アラビドプシス・ハカイラ (*Arabidopsis Hakeia*) から15 kDaの凍害防止ポリペプチドを記載している。

Houdaは、*The Plant Journal*(1995)8(4), 583頁乃至593頁において、小麦からの凍害防止タンパク質を記載している。

さらに、実施例VIIIに記載されているように、キャベツ、ホウレンソウ、ブラシカ・ナパス、及びアラビドプシスは、加熱した後に再結晶阻害タンパク質を有しない。

しかし、これまでのところ、AFP類の使用は、市販の食品には適用されていない。この理由の一つは、AFP類を得るのに高い費用がかかり複雑な方法が必要であることである。もう一つの理由は、これまでに冷凍食品での使用が示唆されたAFP類は、加工の間、特に殺菌工程の間に脱安定化する傾向があるために、標準的な配合ミックスへ組み入れることができないということである。この脱安定化は、AFP類の脱安定化によるものであると考えられており、ペプチド及び

タンパク質について通常観察される、周知の効果である。

本発明は、これらの問題を解決することを目的とする。

驚くことに、新規で比較的簡単な方法によって、寒冷順応する植物のような天然資源からAFP類を分離することができることが発見された。この方法は、殺菌の前に、冷凍製品の準備のために、ミックスへ簡単に組み入れることが可能なAFP類を初めて同定することを可能にした。

第一の観点に従うと、本発明は天然資源からのAFP類を回収する方法に関し、前記方法は以下の工程、

- a) 天然資源からAFPを含む汁を分離し、
- b) 天然資源又はAFPを含む汁を少なくとも60℃へ加熱処理し、
- c) 不溶画分を除去する、

工程を含む。

上記の方法の工程cは、通常、工程a及びbの後に行われる。工程a及びbは、所望の順序で行うことができ、例えば、工程aの後に工程bを行う(この場合、AFPに富んだ汁を加熱する)又は、工程bの後に工程aを行う(この場合、天然資源を加熱する)又は、工程aと工程bを同時に行うことができる。

驚くべきことに、本願発明者らは、本発明の分離方法が、数々の利点を有することを発見した。

第一に、本発明の方法を使用することにより、国際公開第92/22581号の方法で要求される、植物のような天然資源を損傷することを避ける必要がもはやない。特定の加工のための高い研究費用がもはや必要でないため、このことは、例えば、国際公開第92/22581号に比べて、直接AFP類回収方法の産業上の適用を著しく増大させる。

また、高温を使用することにより、天然資源に存在するペプチドの大部分から、天然物質由来の非常に活性な新規なAFP類を選択抽出することが可能であると考えられ、このAFP類は、氷再結晶阻害特性に関して非常に活性のあるペプチドを含む。

第三に、予想に反して、高温の使用は全てのタンパク性物質を変性させるわけではなく、一部のタンパク質を変性させるように思われ、残りのAFP類は増

大した温度安定性を有する。これは、例えば、殺菌工程などのより高温にさらす必要のある組成物中に分離されたAFP類を含むことを可能にさせる。例えば、国際公開第92/22581号のAFP類は、加熱条件下では不安定である（実施例VIを参照のこと）ため、これは、特に驚くべきことである。

本発明の方法は、工程bにおいて天然資源又はAFPに富んだ汁を60℃以上へ加熱することを含む。好ましくは、温度は60乃至110℃、最も好ましくは80乃至105℃である。加熱工程はタンパク質に富んだ汁（工程a）の分離の後又はタンパク質に富んだ汁の分離の前に実施することができる。汁を加熱するのに適するいずれの方法をも使用でき、例えば、従来の、又は超短波の加熱、任意に添加した抽出溶媒との加熱、蒸気をあてることなどが使用できる。

抽出溶媒を使用する場合、AFP画分の不必要な希釈を避けるために少量で使用するが好ましい。いずれの適する抽出溶媒をも使用することができるが、水の使用が特に好ましい。所望であれば、抽出溶媒として使用する前に、水に添加剤を添加することができる。しかし、最も好ましくは、実質的に添加剤を含まない水を使用する。

本発明の方法は、熱安定なAFP類を提供するいずれの天然資源へ適用することとも可能である。このような資源に含まれるのは、植物、魚、昆虫、及び微生物である。天然起源の種又は、遺伝的改変を通して得られた種の両方を使用することができる。例えば、微生物又は植物は、遺伝的に改変してAFP類を発現するようにでき、AFP類は次に本発明の方法に従って分離することができる。したがって、天然資源から直接得られるAFP類と少なくとも80%、より好ましくは95%以上、最も好ましくは100%の相同性を有するAFP類を得ることができる。本発明の目的にかんがみ、この高レベルの相同性を有するタンパク質もまた、AFP類という語の範囲内である。また、AFP類をコードする遺伝子を発現可能なこれらの形質転換された微生物又は植物もまた、本発明の範囲内である。

遺伝子的な操作技術は、本発明に記載された熱安定なAFP類を製造するために使用することができる。適する宿主細胞又は微生物は、所望の熱安定なポリペプチドをコードする遺伝子構造によって形質転換される。熱安定なポリペプチドをコードするヌクレオチド配列を、転写及び翻訳に必要な要素を含む適する発



現ベクターへ挿入し、適切な条件下でそれらが発現する（例えば、適切な向き及び正確な読取り枠で、及び適切な標的化及び発現配列で）ようにすることができる。これらの発現ベクターを構築するのに要求される方法は、当業者に周知である。

多くの発現系が、熱安定なポリペプチドをコードする配列を発現するために使用される。これらは、微生物、酵母、昆虫細胞系、植物細胞培養系、及び植物を含み、全てが適する発現ベクターにより形質転換されるが、これらに限定されるわけではない。

広範囲の種類の植物及び植物細胞系を熱安定抽出物中に分離されたポリペプチドの核酸構築物で形質転換することができる。好ましい態様は、トウモロコシ、トマト、タバコ、ニンジン、イチゴ、ナタネ、及びサトウダイコンを含むが、これらに限定されるわけではない。

好ましくは、AFPは植物に由来する（これは、AFPが直接天然資源としての植物から得られるか、又は、これらのAFP類と高い程度の相同性を有するAFP類が、他の有機体中に遺伝子工学的（transgenerically）に製造されることを意味する）。熱安定なAFP類を含むいずれの植物をも使用することができるが、好ましくはAFP類を含むように寒冷条件下で生長することのできる天然に生じる植物（又は遺伝的に改変された品種）である。特に好ましいのは、冬ライ麦（ウインター・ライ）、多年生の草、及びスゲの使用である。他の適する植物は、例えば、木性植物、冬の穀物（ウインター・シリアル）などの群に由来する。

特に好ましくは、熱安定なAFP類は、アセア・サッカロイド類（*Acer sacharoides*）、竹（*Bamboo*）、ブッドレイア（*Buddleia*）、イソテシウム・マイオスロイド類（*Isothecium myosuroides*）、ラマリナ・ファリナセアエ（*Ramalina farinacea*）、ウセネア・サブフロリダナ（*Usenea subfloridana*）、フォリシティア（*Forsythia*）、オキサリス（*Oxalis*）、ポア・トリヴィアリス（*Poa Trivialis*）、ロリウム・ペレンネ（*Lolium Perenne*）、ホルカス・ラナタス（*Holcus Lanatus*）、ブロムス・ステリリス（*Bromus Sterilis*）、パロディオクロア・フラベラタ（*Parodiochloa flabellata*）、デスカンプシア・アンタルチカ（*Des*

champsia antarctica)、カレックス・アクアチルス (Carex aquatilis)、コロバンティース・

クインテンシス (Colobanthus quintensis) 及びアグロスティス・テヌイス (Agrostis tenuis)、フェスツカ・コントラクタ (Festuca contracta)、及びポア・アヌア (Poa annua) に由来する。

A F P に富んだ汁は、いずれの簡便な方法、例えば、圧縮、ろ過、均質化、抽出などによりその源から分離することができる。好ましくは、植物物質のような A F P の天然資源は、タンパク質に富んだ画分を回収する前、例えば、ろ過の前に、細片又はスラリーにする。この浸軟操作は、例えば、混合器などのいずれの適する方法によっても行うことができる。タンパク質に富んだ汁の回収を容易に行うための形に原料を分割することは、当業者の能力の範囲内で行うことができる。

タンパク質画分の回収及び加熱 (所望の順序で) の後、得られる A F P を含むサンプルは、次に不溶画分を除去し、A F P に富んだ液体画分を保持するためにいずれの簡便な方法でも処理される。不溶画分は、例えば、ろ過、析出などにより除去することができる。A F P に富んだ溶液は、次に、さらなる使用に適する形にするために、A F P 類を濃縮又は分離するといったさらなる加工をこれに行うことが有利である。適する加工の例は、粉末又はペーストを得るための乾燥、A F P 濃縮物を得るためのさらなる濃縮、A F P 類を抽出溶媒から分離するためのクロマトグラフィーなどである。再度、適する分離のために適する手段及び条件を決定することは当業者の能力の範囲内である。

天然資源の中には、上記の方法で得られた A F P 類が二つ以上の異なる A F P 類の混合物からなるものもある。所望であれば、これらの A F P 類を例えばクロマトグラフィーなどの従来の方法、又は分子量などの物理的／化学的特性の差異に基づいた他の方法によって分離することができる。

又、所望であれば、分離した A F P 類のアミノ酸組成物及び配列を決定することができる。これらの決定のためにはいずれの適する方法をも使用することができる。適する方法の例は実施例に記載されている。又、所望であれば、A F P 類

をコードする核酸配列を決定することができる。アミノ酸をコードすることができる核酸配列を含むベクターもまた、本発明の範囲内である。

上記の情報を基に、上記のような有利なAFP類を製造するように他の天然資源を遺伝的に改変することも可能である。適するAFP類の例は実施例に記載されている。

上記の方法で得られたAFP類は、熱処理に耐えることのできる増大された能力を有することが発見された。このようなAFP類は、以前には決して分離されていないと考えられる。上記のように、増大した耐熱性は、例えば殺菌のような熱工程を行う食品での使用に特に有利である。

他の観点に従うと、本発明は、80℃で1時間又は100℃で10時間の熱処理の後に再結晶阻害特性をあまり減少させないことにより確認される熱安定性を有するAFP類に関する。氷の再結晶阻害特性を決定するのに適する方法は、実施例に記載されており、-40℃での急速冷凍及びこれに続く-60℃での1時間の貯蔵を含む。好ましくは、熱処理の後にこのテストにさらされたAFP類は、熱処理されていない同一のAFPを含むサンプルの氷の結晶の大きさと比べて5μm未満しか大きくない氷結晶粒子を結果として生じる。好ましくは、違いは3μm未満、最も好ましくは1μm未満である。

好ましくは、これらのAFP類は、顕著な氷再結晶阻害特性を有するものから選択される。再結晶阻害特性を決定するために適するテストは、実施例VIに示されている。好ましくは、本発明のAFP類は、実施例に記載されているように、氷再結晶阻害アッセイに従って、15μm以下、より好ましくは5乃至15μmの氷結晶の大きさを提供する。

AFP類は、簡便に食品中、好ましくは冷凍又は冷凍を意図される食品中に使用することができる。特に好ましいのは、AFP類を冷凍の前に例えば殺菌又は消毒することによって加熱する食品に使用することである。特に好ましいのは冷凍菓子製品に使用することである。

このような食品の例は、冷凍の前に殺菌を意図されるアイスクリーム・ミックス及びウォーターアイス・ミックスのような冷凍菓子ミックスである。このよう

なミックスは、通常雰囲気温度で貯蔵される。適する製品の形は、例えば、袋やサッシェ中に包装された粉末ミックスである。前記ミックスは、例えば、水、及び任意に他の成分の添加の後、及び任意に曝気の後、冷凍食品の基礎を形成することができる。

適するミックスの他の例は、液体ミックス（任意に曝気された）であり、必要であれば、さらなる成分および任意にさらなる曝気の後、冷凍することができる。

上記のミックスの明らかな利点は、AFP成分の存在がミックスを例えば、店又は家庭の冷凍庫において、受容できない氷結晶形の形成をすることなく、そのため静置冷凍を経て通常得られる製品とは異なる砕けやすさを有するように、静置条件下で、冷凍することができる。

非常に簡便なことに、これらのミックスは、閉鎖された容器（例えば、カートン、バッグ、箱、プラスチックの容器など）へ包装される。一つの単位量用の包装の大きさは一般に10乃至1000 gである。複数個の単位量を収容する場合には、包装の大きさは500kgまでが適する。一般に、包装の大きさは、10 g乃至5000 gである。

上記のように、AFP類を使用した好ましい製品は、アイスクリーム又はウオーターアイスのような冷凍菓子製品である。好ましくはAFP類の濃度は最終的な製品を基に0.0001乃至0.5重量%である。乾燥ミックス又は濃縮物を使用する場合、最終的な冷凍製品中の濃度が上記の範囲内であるように、濃度はより高くてもよい。

驚くべきことに、本発明の組成物は、非常に低濃度のAFP類を含むにもかかわらず、良好な品質とすることができることが発見された。

驚くべきことに、AFP類の濃度は0.1乃至50ppm程度に低くても、冷凍菓子製品中の適する再結晶特性及び温度耐性を提供する。本出願人はいずれかの理論にとられることを望むものではないが、この理由は、冷凍菓子の固体と、AFP類の間の相互作用が、結晶の生長を阻害する卓越した機能をもたらすためであると考え得る。最も簡便には、AFPの濃度は1乃至40ppm、特に好ましくは2乃

至10ppmである。

本発明の目的にかんがみ、冷凍菓子製品という語は、アイスクリーム、フローズンヨーグルト、シャーベット、ソルベ、アイスマイルク及びフローズンカスタードのような牛乳を含む冷凍菓子、ウオーターアイス、グラニタ、及び冷凍フルーツピューレを含む。適用によっては、発酵された食品中の使用はあまり好ましくない。

好ましくは、冷凍菓子中の固体（例えば、砂糖、脂肪、フレーバー剤など）の濃度は、4重量%より多く、例えば、30重量%より多く、より好ましくは40乃至70重量%である。

本発明の冷凍菓子製品は、いずれの適する冷凍菓子の製造方法によっても製造することができる。しかし、特に好ましくは配合物の全ての成分は、殺菌の前及び冷凍工程が開始される前に十分に混合される。冷凍工程は、例えば、華氏-30度以下の温度への硬化工程を含むことが有利である。

#### 実施例 I

先ず汁を回収し、続いて熱処理及びAFPを分離することによるAFP類の分離

冬ライ麦（ハロ(Halo)種）を1月に刈り取った（この月の平均温度は3.5℃であり、植物は確実に適切な寒冷順化をした）。組織を後の処理のために迅速に実験室へ輸送し、水で洗浄して汚れを除去した。

切片400gを雰囲気温度でワリング（Waring）混合器で800gの水とともに葉の組織が完全に破壊されるまで均質化した。4層のモスリンを通してろ過することにより、AFPに富む汁を回収した。

AFPに富んだ汁を次に10分間沸騰することにより温度処理にさらした。これは、タンパク質の析出を生じさせ、本発明に使用するAFPが溶液中に残った。上清を15,000gで20分間遠心分離するか、又はモスリンを通してさらにろ過させて析出物から分離する。

AFP類は、凍結乾燥により上清から分離することができる。

対照の目的のため、冬ライ麦のアポプラスチック（apoplastic）抽出物（細胞

外抽出物)を以下のようにして得た。30日間寒冷順化したライ麦植物由来の葉を3cmの長さに切り、蒸留水で洗浄して葉の内容物を除去した。葉の細片をペーパータオルで拭き取って乾燥させ、全体を5 mM EDTA、10 mM アスコルビン酸、2 mM カブロン酸、2 mM ベンズアミジン、及び1 mMフェニルメチルスルフォニルフルオライド (PMSF) の抽出培養液中に浸漬した。次に、これを60分間ブフナーフラスコ中で真空ろ過させた後、葉を除去して完全に拭き取って乾燥させた。

次にこれを切り取りプラスチックシリンジの円筒に縦に並べて、丁寧に2000gで30分間遠心分離した。アボプラスチック抽出物をシリンジの下のエッペンドルフチューブに回収した。

#### 実施例II

先ず天然資源を加熱し、続いてAFPに富んだ汁を分離し、及びAFPを分離する、AFP類の分離

混合された草組織 (ポア・トリヴィアリス、ロリウム・ペレンネ、ホルカス・ラナタス、プロムス・ステリリス) を1月に切り取った (この月の平均気温は3.5℃であり、これらの植物は確実に適切に寒冷順化した)。さらなる取り扱いのために草の組織を迅速に実験室へ輸送し、水で洗浄して汚れを除去した。

切片500gを650ワットの電子レンジに配置し、フルパワーで5分間加熱し、温度を85乃至100℃へ上昇させた。次に草の切片を雰囲気温度まで冷却した。

代わりに、草の切片を500gの沸騰水と混合し、混合物を100℃へ再度加熱し、続いて攪拌下10分間沸騰させ、次に60℃へ冷却する。

加熱工程の後、AFPに富んだ汁をろ過によって切片から分離した。塊を5分間同容積の水の存在下で連続的に攪拌し、次に3層のモスリンを通して絞った。

上清を凍結乾燥して水を除去し、貯蔵した。代わりに、上清を貯蔵のために冷凍することもできる。

#### 実施例III

アイスクリームを製造するための液体プレミックスを以下を混合して製造した。

成分	重量%
スキムミルクパウダー	11.390
ショ糖	3.410
マルトデキストリン (MD40)	4.000
イナゴマメゴム	0.072
コーンシロップ63DE	20.705
グアールゴム	0.048
ゼネラクタ (Genulacta) L100	0.020
バター	9.015
アビセル(Avicel) RC581	0.240
ゼラチン	0.140
モノグリセリド (パルチミン酸エステル)	0.450
バニリン	0.010
A F P (実施例 I の*)	0.100又はなし (対照)
水	残部

\*記：A F Pは希釈剤として添加した水を使用して、濃縮したA F Pとして添加し、百分率はA F Pの量をいう。

このミックスを85℃で15秒間簡便に殺菌し、缶の中で冷蔵して貯蔵した。

このミックスを従来の家庭用混合器でオーバーランが約100%となるようにホイップし、続いて家庭用冷凍庫で静置冷凍することによって、これをアイスクリームの製造に使用することができるようになる。本発明の組成物は対照のサンプルよりも著しく良好な碎けやすさを有する。

実施例 I のA F Pの代わりに実施例IIのA F Pを使用することにより非常に良好な結果が得られる。

#### 実施例IV

アイスクリームを製造するための液体プレミックスを以下を混合して製造した。

成分	重量%
----	-----

スキムミルクパウダー	10.00
ショ糖	13.00
マルトデキストリン (MD40)	4.00
イナゴマメゴム	0.14
バター油	8.00
モノグリセリド (パルチミン)	0.45
バニリン	0.01
A F P (実施例 I の*)	0.10又はなし (対照)
水	残部

\* 記：A F Pは希釈剤として添加した水を使用して、濃縮したA F Pとして添加し、百分率はA F Pの量をいう。

この成分を雰囲気温度で混合した後、89℃で60秒間殺菌した。ミックスを500mlのパックに無菌的に充填し、密閉し、雰囲気温度で貯蔵した。

このミックスを従来の家庭用混合器でオーバーランが約70%となるようにホイップし、続いて家庭用冷凍庫で静置冷凍することによって、アイスクリームの製造に使用することができる。

2ヶ月貯蔵した後、本発明の組成物は、対照サンプルに比べて著しく良好な碎けやすさを有した。

実施例 I のA F Pの代わりに実施例IIのA F Pを使用することにより非常に良好な結果が得られる。

#### 実施例 V

実施例IVを繰り返したが、今回は無菌的に充填及び密閉する前に、オーバーラン70%となるように、アイスクリームミックスを予め曝気させた。

得られた生成物は、雰囲気温度で貯蔵することができ、アイスクリームは、家庭用冷凍庫にミックスを配置し、静置条件下で冷凍することによって製造することができる。

#### 実施例 VI

A F P類の氷の再結晶阻害特性を以下のようにして決定することができる。



A F Pを含む生成物のサンプルをショ糖の濃度が30重量%となるように調節した（サンプルの初期濃度が30%より高い場合、これを希釈することにより行

い、初期濃度が低い場合、ショ糖を添加して30%の濃度とした）。

サンプルの3 $\mu$ lの滴を22mmのカバースリップに配置した。次に、直径16mmのカバースリップをその上に配置し、200gの重りをサンプル上に配置し、スライドを均一の厚みにした。カバースリップの端を透明なマニキュアで密閉した。

スライドをリンカーム(Linkham)THM600温度制御顕微鏡のステージに配置した。ステージを迅速に（1分あたり50℃）-40℃へ冷却し、多数の小さい結晶を生じた。次にステージの温度を迅速に（1分あたり50℃）-6℃へ上昇させ、その温度を維持した。

氷相を-6℃でライカ・アリストプラン(Lcica Aristoplan)顕微鏡を使用し、て観察した。ラムダ平面に分極光の条件を使用して氷の結晶の対比を促進させた。氷相の状態（氷の結晶の大きさ）は、T=0及びT=1時間で35mmの顕微鏡写真で記録した。

一般に、このテストはA F P及び水を含む組成物のいずれの適するものにも適用することができる。一般に、このようなテストの組成物中のA F Pの濃度は、あまり重要ではなく、例えば、0.001乃至0.5重量%、より好ましくは0.0005乃至0.1重量%、最も好ましくは0.001乃至0.05重量%、例えば0.01重量%である。

A F P及び水を含む組成物のいずれの適するものも、テストを実施するために使用することが出来る。しかし、一般に、精製された形のA F Pを得ることは必ずしも必要ではない。実際の使用では、液体抽出物又は天然原料からの汁を用意することが、この抽出物又は汁をテストするのに通常十分である。

この方法は、例えば実施例I又はIIで得られたように、濃縮工程を伴うか、伴っていない、A F Pを含む抽出物に適用することができる。

いくつかのサンプルの再結晶阻害特性を測定した。サンプルは、年間、いくつかの時点で収穫されたライ麦から得た。実施例Iに従って抽出及び加熱した後、得られたA F Pの汁を、その再結晶特性について上記のように測定した。比較として、温室で（通常A F P生成が誘導されない温度で）生長したライ麦を使用し

た。

以下の氷結晶の大きさを測定した。

サンプル	1 時間後の氷の結晶の大きさ ( $\mu\text{m}$ )
対照	25
12月のサンプル	17
1月のサンプル	10
2月のサンプル	15
3月のサンプル	18
4月のサンプル	18
5月のサンプル	25

これらの測定は、良好なAFP活性のためには、植物は冬の月、すなわち、12月から4月の間に収穫されるべきであることを示した。特に好ましくは、 $15\mu\text{m}$ 以下の氷の結晶の大きさをもたらすことができるサンプルである。この場合、これは、植物を1月又は2月に収穫することにより達成できる。

同様の測定を加熱処理（ $60^{\circ}\text{C}$ で1時間）された1月のAFPサンプルについて行った。再結晶特性の著しい減少は観察されなかった。

比較として、実施例Iのアポプラスチック抽出物を使用して測定した。このときは、1時間後の最終的な氷結晶の大きさが $11.1\mu\text{m}$ であった。 $100^{\circ}\text{C}$ で10時間の沸騰による加熱処理の後、テストの結果は1時間後の氷結晶の大きさが $16.8\mu\text{m}$ となった。この実施例は、冬ライ麦からのアポプラスチック抽出物は熱安定性でないことを示している。

#### 実施例VII

1月に収穫した、加熱処理していない草の抽出物をシルソエ（Silsoe）英国から得た。この抽出物を1時間以下のように遠心分離して汚れと不溶性の破砕物を除去した。遠心分離器：ソーバル（Sovall）RC3C、ローター：H6000A、温度： $+5^{\circ}\text{C}$ 、ローター速度：5000rpm（7268g）。

抽出サンプルを凍結乾燥し、総固体含量を測定した。これは、 $11.48\text{mg/ml}$ であると分かった。次に乾燥された抽出物を30%ショ糖溶液で再び溶かし、その

最初の総固体濃度とした。必要に応じて30%のショ糖溶液で抽出物を希釈することによっていくつかの溶液を調製した。

不凍活性は、実施例VIのアッセイを使用して測定した。

再結晶阻害アッセイのT=0及びT=1時間の写真は、ツァイス (Zciss) TGA10分析器を使用して氷の結晶の平均の大きさを測定するのに使用した。得られた結果を以下の表に示す。

サンプル	総固体含量(mg/ml)	氷の結晶の大きさ ( $\mu\text{m}$ )		-6°Cで1時間の氷の結晶の生長 ( $\mu\text{m}$ )
		T=0	-6°Cで T=1 時間	
希釈しない	11.48	5.2	7.3	2.1
50%抽出	5.74	5.5	7.6	2.1
25%抽出	2.87	6.3	8.9	2.6
12.5%抽出	1.435	6.6	13.1	6.5
6.25%抽出	0.7175	8.1	14.7	6.6
3.125%抽出	0.359	7.4	17.0	9.6
1.5625%抽出	0.179	9.0	20.3	11.3

これらの結果は、草の抽出物の種々の希釈物によって、-6°Cで1時間の後の様々な最終的な結晶の大きさ及び氷の結晶の大きさの変化を示す。良好な再結晶阻害特性を得たままで、草の抽出物中の固体レベルは、広範囲で変化することが観察された。好ましくはこれらの濃度は1時間後の氷の結晶の大きさが15 $\mu\text{m}$ 以下であるように選択される。

同様のテストを熱処理 (100°Cで10分間) にさらした草の抽出物で行った。再結晶阻害特性の重大な低下は観察されなかった。

加えて、実施例IIの草の抽出物を、同様の再結晶阻害テストを使用してテストした。以下の結果が測定された。

熱処理	結晶の大きさ ( $\mu\text{m}$ )	
	T = 0	T = 1
60°Cで1時間	9.6	11.1
沸騰10分間	9.8	11.3

これらの結果は寒冷順化した草の抽出物を加熱した後でも氷の結晶の生長を阻

害する能力が維持されていることを示す。

#### 実施例VIII

A F Pを含むいくつかの植物を1月に収穫した。例えば、根、茎、つぼみ、又は葉のような新鮮な組織を、等容量の緩衝液A (10mMEDTA、20mMアスコルビン酸、トリスでpH7.4へ緩衝させる) 中で、氷に保持された乳棒と乳鉢で(4℃へ冷却) 挽くことによって抽出物を得た。均質化したものを一層以上のモスリンでろ過し、更なる使用の前に氷上に保持した。

抽出物を、60℃で1時間加熱した後、及び10分間沸騰させた後の両方で、実施例VIの再結晶阻害テストに付した。

以下の植物は再結晶阻害特性を保持することにより確認されたように、熱安定なA F P類を含んだ。アセア・サッカロイド類、竹、ブッドレイア、イソテシウム・マイオスロイド類、ラマリナ・ファリナセアエ、ウセネア・サブフロリダナ、フォリシティア、オキシサリス、ボア・トリヴィアリス、ロリウム・ペレンネ、ホルカス・ラナタス、ブロムス・ステリリス、パロディオクロア・フラベラタ、デスカンプシア・アンタルチカ、カレックス・アクアチルス、コロバンティース・クインテンシス及びアグロスティス・テヌイス、フェスツカ・コントラクタ、及びボア・アヌア。

以下の植物は熱安定なA F P類を含まなかった。キャベツ、ホウレンソウ、ブラシカ・ナパス、及びアラビノプシス。

#### 実施例IX

A F P類の温度ヒステレシス活性を以下のように測定することができる。

1mlのサンプルを温浴中のエッペンドルフに配置し、60℃で1時間加熱した。

次にサンプルの温度ヒステレシス特性を以下のように測定した。

融解した製品をマイクロスライド (カンラブ・ケンブリッジ (Camlab Cambridge、パス長(path length)0.1mm) に配置する。マイクロスライドの端を石油で密閉する。

エアロゾル冷凍スプレーを使用して氷をサンプルへ導入する。次にスライドを、-0.1℃へ温度制御されたエタノール浴へ浸漬した。5分間平衡させた後、サ

ンプルをチェックする。氷が完全に融解する場合、温浴の温度を、 $0.1^{\circ}\text{C}$ ずつ低くして平衡させた。これらの工程は、氷結晶の少量がサンプル中に存在する温度へ到達するまで繰り返す。その温度で平衡した後、温浴の温度を一分あたり $0.01^{\circ}\text{C}$ ずつ段階的に低下させた。サンプルの凝固点は、氷の普及が平衡された結晶から生じる温度として記録する。

次に、全ての氷結晶が融解するまで凝固点から温度を一分あたり $0.01^{\circ}\text{C}$ ずつ段階的に上昇させることによってサンプルの融点を測定する。この温度は、サンプルの凝固点である。

サンプルの温度ヒステシスは、融点と凝固点の間の違いである。

このテスト法は、第一のサンプル（熱処理前）及び熱処理後冷却した第二のサンプルについて行う。

サンプルを30秒間水中で沸騰させ、温度ヒステシスを決定することにより、同様に、熱安定性を上記のテストのように測定することができる。いくつかのサンプルの温度ヒステシスを測定した。

年間のいくつかの月に収穫された冬ライ麦からサンプルを得た。実施例Iにしたがって抽出及び加熱後に得られたAFPに富む汁を、その温度ヒステシスについて、実施例IVのように測定した。比較として、温室（通常AFP形成の誘導が生じない温度で）生長した冬ライ麦を使用した。

以下の氷結晶の大きさを測定した。

サンプル	温度ヒステシス ( $^{\circ}\text{C}$ )
対照	0.04
12月のサンプル	0.18
1月のサンプル	0.21
2月のサンプル	0.17
3月のサンプル	0.15
4月のサンプル	0.12
5月のサンプル	0.05

これらの測定は、良好なAFP活性のためには、植物は冬の月、すなわち、12

月から3月の間に収穫されるべきであることを示した。

同様の測定を加熱処理（60℃で1時間）された1月のAFPサンプルについて行った。再結晶特性の重大な減少は観察されなかった。

#### 実施例X

##### AFP類のアミノ酸配列の決定

10kDa分離膜とともにアミコン（Amicon）超遠心チャンバーを使用して、実施例IIの熱安定な草の抽出物を約10倍に濃縮した。得られた濃縮物をモノ（Mono）Q（ファルマシア（Pharmacia））HR5/5FPLC陰イオン交換カラムに負荷した。カラムを50mMのトリス/HCl緩衝液pH8.5につなぎ、NaClを同じpH8.5のトリス緩衝液中最終濃度0.5Mへ線形的にグラジエントして、RI活性の画分を溶出した。クロマトグラフィーを1ml/分の流速で実施し、1mlの画分を回収し、再結晶阻害活性をアッセイした（実施例IXのように）。

活性画分と一緒にプールし、10,000rpmで10分間ソルボール（Sorvall）SS34ローター（8×50ml）中で遠心分離されたセントリコン（centricon）PM10遠心濃縮器（アミコン）で0.05mlの容積へ濃縮した。SMARTマイクロ分離系（ファルマシア）に操作されているスパデックス（Superdex）75PC3.2/30ゲルろ過カラムに濃縮物を負荷した。カラムを、50mMトリス/HCl緩衝液pH8.5を0.05ml/分の流速で溶出した。サンプルを3.5mlの総容積に負荷した後に、0.05mlの画分を回収した。画分を再結晶阻害活性のためにアッセイし（実施例IXのように）、最も活性のある画分をSDS PAGEゲル上での分離にさらし、N-末端シーケンシングの前にエレクトロブロットニングした。

活性のあるスパデックス75画分をゲル充填緩衝液（50mMトリス/HCl、pH6.8、10%グリセロール、10mMジチオスレイトール（dithiothreitol）、2%SDS）中にとり、次に、ラエミリ（Laemmli）法にしたがって、10%ポリアクリルアミドゲル上で分離した。電気泳動の後、ゲルをメタ

ノールで湿らせたプロブロット（Problott）（パルキン・エルマー（Perkin Elm

cr) 膜のシートに挟み、10%メタノールを含む10mM3 (シクロヘキシルアミノ) -1-プロパンスルホン酸 (CAPS) 緩衝液 (pH11.0) 中で20Vで16時間エレクトロブロットニングする。ブロットニングの後、膜をメタノール、及び次にミリ (Milli) Q (ミリポア (Millipore)) 水で簡単に洗浄し、結合したタンパク質を0.1% (W/V) クマシーブリリアントブルー溶液で視覚化した。

見掛けの分子量が25kDa及び35kDaの二つのタンパク質のバンドが、クマシー染色によって視覚化された。35kDaのタンパク質は、最もRI活性のある画分に特に近接して関連するようには見えた。これらのバンドの両方を、外科用メスで削ぎ取り、シークエンシングした。見掛けの分子量が65乃至75kDaに相当する膜の染色されていない領域もまたシークエンシングに付したが、これは、最も活性のある画分のゲルの銀染色が以前この分子量でタンパク質のバンドを示したためである。

膜のこれらの3つのそぎ取られた領域を、ブロット (Blott) シークエンシングカートリッジに負荷することによってシークエンスし、配列は、製造者 (パルキン・エルマー) によって記述された方法にしたがって反応及び変換サイクルを使用して決定した。N-末端配列リストを以下に示す。

25kDaのAFPは、

ALA-THR-ILE-THR-ALA-VAL-ALA-VAL-LEU  
-LYS-X-THR-VAL-GLU-VAL-X-ILE-VAL-PRO  
-THR

と実質的に相同であるN末端からの配列を含む。

35kDaのAFPは、

ALA-GLN-PHE-THR-ILE-THR-ASN-LYS-CYS  
-GLN-PHE-THR-VAL-TRP-ALA-ALA-X-VAL-PRO  
RO

と実質的に相同であるN末端からの配列を含む。

65乃至70kDaのAFPは、

X-GLU-GLN-PRO-ASN-THR-ILE-X-GYL-THR

と実質的に相同であるN末端からの配列を含む。

各配列において、Xは植物タンパク中に見受けられるアミノ酸のいずれかである未知のものをさす。本発明の目的において、実質的に相同であるという語は、アミノ酸の少なくとも80%、より好ましくは90%以上、最も好ましくは95乃至100%が重複することを意味する。



【手続補正書】特許法第184条の8第1項

【提出日】平成10年7月23日（1998. 7. 23）

【補正内容】

請求の範囲

1. 天然資源から請求項2乃至4記載の一つ以上のAFP類を回収する方法であって、前記方法は、

I.a AFPを含む汁を天然資源から分離し、次に少なくとも60℃の温度へその汁を加熱処理するか、又は、

I.b 天然資源を少なくとも60℃の温度へ加熱処理し、続いて天然資源からAFPを分離し、

II. 不溶性画分を除去する、

工程を含み、工程I.a又はI.bは、工程IIの前に行われる、方法。

2. 植物から得られるAFP類であって、氷の再結晶阻害特性において著しい減少を示さないことによって確認される熱安定性を有するものであり、このことは60℃で1時間、80℃で1時間、又は100℃で10分間熱処理した後、-40℃へ急速冷凍し、続いて-6℃で1時間貯蔵された水中の熱処理されたAFPの組成物の氷結晶の大きさが、熱処理されない同一のAFPの氷結晶の大きさよりも5μm未満しか大きくないことによって確認される、熱安定性を有するAFP類。

3. -40℃への迅速な冷凍の後-6℃で1時間貯蔵した水中のAFPの組成物の氷結晶の大きさが、15μm以下である、請求項2記載のAFP類。

4. 25kDa、35kDa、及び65乃至75kDaの分子量を有するタンパク質を一つ以上含み、25kDaのAFPが、

ALA-THR-ILE-THR-ALA-VAL-ALA-VAL-LEU-  
LYS-X-THR-VAL-GLU-VAL-X-ILE-VAL-  
-PRO-THR、

35kDaのAFPが、

ALA-GLN-PHE-THR-ILE-THR-ASN-LYS-CYS-  
GLN-PHE-THR-VAL-TRP-ALA-ALA-X-V

AL-PRO、

65乃至70kDaのAFPが、

X-GLU-GLN-PRO-ASN-THR-ILE-X-GYL-T

HR

と実質的に相同であるN末端配列を含む、請求項2記載のAFP類。

5. 少なくとも一つの請求項4記載のAFP類をコードすることのできる核酸配列を含むベクター。
6. 少なくとも一つの請求項4記載のAFP類を発現することのできる形質転換された有機体。
7. 0.0001乃至0.5重量%の、請求項2記載のAFPを含む、冷凍菓子製品。
8. 請求項2記載のAFPを含む、請求項7記載の冷凍菓子製品の製造に使用するのに適するプレミックス。
9. 0.0001乃至0.5重量%のAFPを含む配合されたミックスの調製を含む冷凍菓子製品の製造法であって、前記AFPは、60℃で1時間、80℃で1時間、又は100℃で10分間熱処理した後、静置条件下でミックスを冷凍することによって、氷の再結晶阻害特性において重大な減少を示さないことによって確認される、熱安定性を有する、方法。

## 【国際調査報告】

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

<b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b> IPC 6 C12N15/29 C07K14/415 A23G9/02 A23L3/36		Intern. App. No. PCT/EP 97/03634
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
<b>B. FIELDS SEARCHED</b> Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) IPC 6 C07K A23G		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)		
<b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b>		
Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	HINCHA DK ET AL: "CRYOPROTECTIVE LEAF PROTEINS - ASSAY-METHODS AND HEAT-STABILITY" JOURNAL OF PLANT PHYSIOLOGY, 1992, 140, 236-240, XP000614564 see abstract	1-3
Y	see page 239, left-hand column, paragraph 3; figure 3	8-12
X	VOLGER H G ET AL: "CRYOPROTECTIVE LEAF PROTEINS" BIOCHIMICA ET BIOPHYSICA ACTA, 412 (2), 1975 335-349., XP000616065 see abstract see page 341, paragraph 5 - page 342, paragraph 1 --- -/--	3
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of box C.		
<input checked="" type="checkbox"/> Patent family members are listed in annex.		
* Special categories of cited documents:		
*A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance *E* earlier document but published on or after the international filing date *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed		
*T* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention *X* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone *Y* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art. *a* document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 24 September 1997		Date of mailing of the international search report 06. 10. 97
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.B. 3111 Patentlaan 2 NL - 3200 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Telex 31 631 epo nl, Fax (+31-70) 340-3016		Authorized officer Gurdjian, D

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No.  
PCT/EP 97/03634

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	WO 92 22581 A (UNIV WATERLOO) 23 December 1992 see claims 1-26 ---	10-12
Y	LIN, C.: "A cold-regulated Arabidopsis gene encodes a polypeptide having potent cryoprotective activity" BIOCHEMICAL AND BIOPHYSICAL RESEARCH COMMUNICATIONS., XP002027263 see the whole document ---	8,9
A	BOOTHE JG ET AL: "EXPRESSION OF A LOW-TEMPERATURE-INDUCED PROTEIN IN BRASSICA-NAPUS" PLANT PHYSIOLOGY, 1995, 108, 795-803, XP002027264 see the whole document ---	1-3
X	MEYEN L G ET AL: "CHARACTERIZATION OF A SPINACH GENE RESPONSIVE TO LOW TEMPERATURE AND WATER STRESS" PLANT MOL BIOL, 21 (2). 1993. 291-305., XP002027265 see page 293, right-hand column, paragraph 3 ---	3
X	SALZMAN R ET AL: "Cold acclimated buds of Vitis spp. express boiling-stable polypeptides analogous to fish antifreeze proteins" 18TH ANNUAL MEETING OF THE ASEV (AMERICAN SOCIETY FOR ENOLOGY AND VITICULTURE)/EASTERN SECTION, ROCHESTER, NEW YORK, USA, JULY 1993. AMERICAN JOURNAL OF ENOLOGY AND VITICULTURE, 44 (4). 1993. 468., XP002027266 see abstract ---	3
X	HOUDE M ET AL: "Immunolocalization of freezing-tolerance-associated proteins in the cytoplasm and nucleoplasm of wheat crown tissue" PLANT JOURNAL, 8 (4). 1995. 583-593., XP002027267 see abstract ---	3
X	LIN C ET AL: "DNA SEQUENCE ANALYSIS OF A COMPLEMENTARY DNA FOR COLD-REGULATED ARABIDOPSIS GENE COR15 AND CHARACTERIZATION OF THE COR 15 POLYPEPTIDE" PLANT PHYSIOL (BETHESDA), 99 (2). 1992. 519-525., XP002027268 see abstract -----	3

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No.

PCT/EP 97/03634

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 9222581 A	23-12-92	AU 1907192 A	12-01-93
		CA 2110510 A	23-12-92
		EP 0589928 A	06-04-94
-----			

## フロントページの続き

(81)指定国 EP(AT, BE, CH, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OA(BF, BJ, CG, CI, CM, GA, GN, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AP(GH, KE, LS, MW, SD, SZ, UG, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CU, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, GB, GE, GH, HU, IL, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, UA, UG, UZ, VN, YU, ZW

(72)発明者 マッカーサー、アンドリュー・ジョン  
英国、シャーンブロック・エムケイ44・1  
エルキュー、ユニリーパー・ハウス、ユニ  
リーパー・リサーチ・コロワース・ラボラ  
トリー (番地なし)

(72)発明者 サイドボトン、クリストファー・マイケル  
英国、シャーンブロック・エムケイ44・1  
エルキュー、ユニリーパー・ハウス、ユニ  
リーパー・リサーチ・コロワース・ラボラ  
トリー (番地なし)

(72)発明者 ワイルディング・ピーター  
英国、シャーンブロック・エムケイ44・1  
エルキュー、ユニリーパー・ハウス、ユニ  
リーパー・リサーチ・コロワース・ラボラ  
トリー (番地なし)